

高效液相層析儀檢驗法與化學滴定法及光度分析檢測法 在磺胺劑類及類固醇賀爾蒙製劑之檢定比較試驗

龔培森* 劉敏主 林金梅 許瑜芬 林士鈺

台灣省家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要 含磺胺一甲氧嘧啶之動物用藥品製劑檢定時：以化學滴定法（亞硝酸鈉滴定進行芳香一級胺偶氮反應檢），光度分析檢測法（與 3% 香莢蘭醛反應，UV 397 nm 光譜圖檢測）、高效液相層析檢驗法（Lichrosorb R-18 管柱，CH₃CN：1% Acetic acid 25：75 為移動相，280 nm 檢測波長檢測）；含 prednisolone 動物用藥品製劑以光度分析檢測法（與四吡啶啉藍，氫氧四鉀銨反應，UV 525 nm 光譜圖檢測），高效液相層析檢驗法（Lichrosorb RP-18 管柱，甲醇：水 = 58：42 為移動相，254 nm 檢測波長）均可得良好之檢驗結果，惟化學滴定法及光度分析檢測時雖能達成成份含量之測定但對 Sulfa Drug 之同類藥物間、Prednisolone 之不同鹽類間，一般無法分辨，而高效液相層析儀檢測時則能同時達成成份含量測定及鑑別試驗。

關鍵詞： 高效液相層析儀，光度分析，化學滴定法，醣質類固醇類賀爾蒙

緒言

科學不斷進步，藥品工業急速發展，政府自民國 71 年起為提升國內動物用藥品質，全面推廣動物用藥品 G.M.P 規範，因此對製程與品管的要求也就更加嚴格，藥品分析方法也隨著時代進步發展而有改進。一般化學藥品於藥典所載檢驗方法以滴定法及 UV 法為多，HPLC 法較少收載，但最近 HPLC 已較廣為使用。本實驗乃舉含磺胺一甲氧嘧啶（Sulfamonomethoxine）製劑，應用亞硝酸鈉滴定、光度分析、HPLC 檢測同時化驗及含 Prednisolone 製劑之光度分析及 HPLC 檢測，比較彼此二者間之關係，以提供藥廠制定藥品檢驗規格之參考。

試驗材料與方法

(一)儀器設備：

1. 高效液相層析儀：HITACHI AS-2000 Autosampler, L-4250 UV-VIS Detector, L-6200A Intelligent Pump
2. 分光光度計：HITACHI U-3210 Spectrophotometer

(二)檢 品：

送至本分所檢驗之動物用一般化學藥品。

(三)試驗方法：

I 磺胺劑類

1. HPLC 法檢測：

本檢測法乃依郭等⁽²⁾ 稍以修改：

(1)HPLC 法檢測條件：

移動相：Acetonitrile：1% Acetic Acid 25：75

分離管：Lichrosorb RP-18

波 長：280 nm

流 速：1.0 ml/min

(2)繪製校正曲線：

本檢測法乃依郭等⁽³⁾ 稍以修改：

精取 Sulfamonomethoxine 標準品 20 mg 置 20 ml 容量瓶中，加甲醇定容，並以甲醇稀釋成最終濃度 5、10、15、20 PPM，且分別加入相同量（使最終濃度為 10 PPM）之 Sulfamerazine 當作內標準品，注入 HPLC

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

分析條件，每個濃度重覆四次求取波峰面積平均值，再計算標準品與內標準品面積比 (A1/A2)，將數據作一表，繪製一標準曲線圖 (圖二)。

(3)送檢樣品檢測：

檢品以甲醇稀釋使成最終濃度 10 PPM，亦加入 Sulfamerazine 當作內標品並使成最終濃度 10 PPM，注入 HPLC 分析，依檢測波峰面積計算檢品與內標準品面積比，由校正標準曲線圖計算檢品之濃度。

2. 分光光度計法檢測：

(1)繪製校正曲線圖：

本檢測法乃依郭等⁽³⁾稍以修改：

精取 Sulfamonomethoxine 標準品 25 mg，置 100 ml 容量瓶中加入 1N HCl 定容當作原液，而後再取 10、15、20 ml 分別加入 20 ml 3% 香莢蘭醛液，再加 1N HCl 定容至 100 ml。另作一空白，測其吸光度而後繪製標準校正曲線圖。

(2) 檢品精確取相當於 25 mg Sulfamonomethoxine 加 1N HCl 定容至 100 ml，而後取 15 ml，加入 20 ml 3% 香莢蘭醛液再加 1N HCl 定容至 100 ml，於 397 nm 下測其吸收值，由校正曲線圖測定溶液中 sulfamonomethoxine 之 mg 數。

3. 化學滴定法：

精取檢品 (相當於 Sulfamonomethoxine 500 mg) 置於錐形瓶中加入鹽酸 20 ml 及 H₂O 50 ml，加碎冰約 25 g 冷卻至 15 °C 以下以 0.1 M Sodium Nitrite 依中華藥典第三版⁽¹⁾磺胺劑滴定法徐徐滴定，每 ml 0.1 M NaNO₂ 試液相當於 29.832 mg of Sulfamonomethoxine。

II 類固醇類

1. HPLC 法檢測：

本檢測法及依 BPV 1985⁽⁴⁾稍以修改：

(1)HPLC 法檢測條件：

移動相：MeOH：H₂O=58：42

分離管：Lichrosorb RP-18

波長：254 nm

流速：1.0 ml/min

(2)繪製校正標準曲線：

精取 Prednisolone 標準品 100 mg 置 100 ml 容量瓶中，加甲醇至定容，再以甲醇稀釋使成最終為 75、100、125 PPM 三種濃度，且分別加入使成最終濃度為 100 PPM 之 Dexamethasone 當作內標準品，注

入 HPLC 分析，每個濃度重覆四次，求取波峰面積平均值，再計算標準品與內標準品面積比 (A1/A2)，將數據作表及繪製標準曲線圖 (圖四)

(3)送檢樣品檢測：

檢品以甲醇稀釋使成最終濃度 100 PPM，亦加入 Dexamethasone 當作內標品並使成最終濃度 100 PPM，注入 HPLC 分析，依檢測波峰面積計算檢品與內標準品面積比，由校正標準曲線圖計算檢品之濃度。

2. 分光光度計法檢測：

(1)繪製校正曲線圖：

本檢測法乃依中華藥典 III⁽¹⁾稍以修改：

精取 Prednisolone 標準品 20 mg，置 20 ml 容量瓶中，加乙醇稀釋至最終為 7.5、10、12.5 PPM 三種濃度，各取 20 ml 置 50 ml 燒杯中，另一燒杯置乙醇 20 ml 作為空白對照，各加四吡唑淋藍試液 2 ml 混合均勻，再加氫氧化四甲銨試液 20 ml，混合均勻，於暗處放置 90 分鐘，以分光光度計於波長 525 nm，測定各溶液吸光度，而後繪製校正標準曲線圖 (圖三)。

(2)送檢樣品檢測：

檢品以乙醇稀釋使成最終濃度 10 PPM 後，取 20 ml，同上步驟測其吸光值，由校正標準曲線圖中求取檢品之含量。

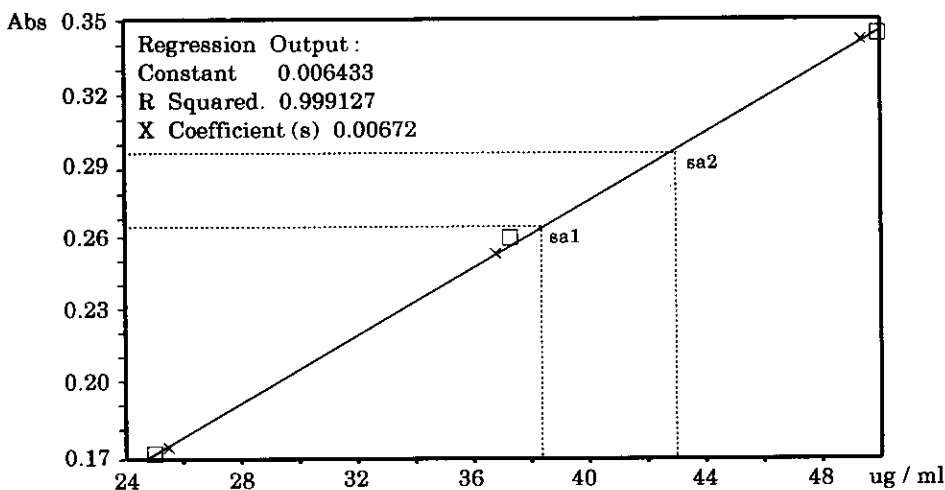
結果

I 磺胺劑類：

1. 化學滴定法所得結果檢品 1、檢品 2 Sulfamonomethoxine 分別相當於標示含量之 102.1%、107.9%。
2. 分光光度計檢測下所得結果紀錄 (圖一)，檢品 1、檢品 2 之 Sulfamonomethoxine 相當於標示含量之 102.4%、114.4%。
3. Sulfamonomethoxine 標準品及檢品 HPLC 檢測所得之結果 (圖二) 檢品 1、檢品 2 之 Sulfamonomethoxine 分別相當於標示含量之 91%、38%，檢品 1 雖標示其含有相對應之濃度但 HPLC 檢測發現波峰滯留時間與標準品已有不符，檢品 2 則為濃度不足且在 15.23 分有一波峰出現 (圖五)。

II 醣質類固醇荷爾蒙

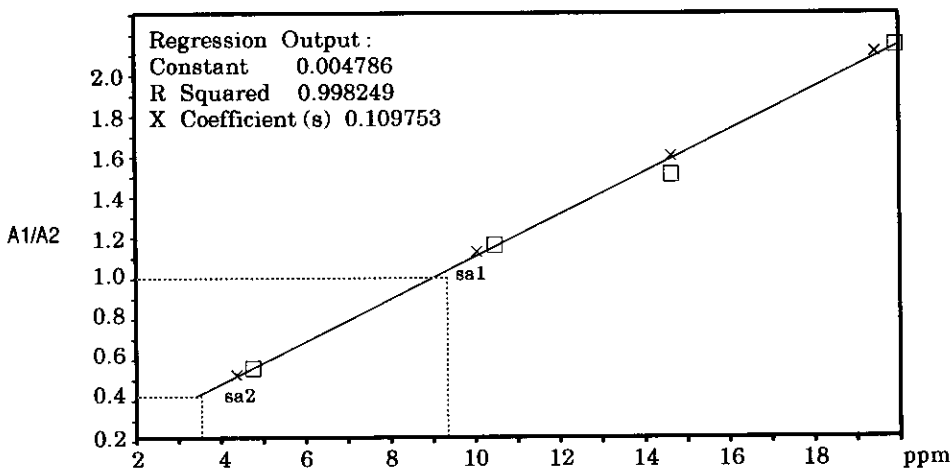
1. 分光光度計檢測下所得結果紀錄 (圖三)，檢品 1、檢品 2 之 Prednisolone 分別相當於標示含量之 102% 及 93%。



□ 為測定值 -X-X- 迴歸線
 ----- 為檢品 1, 2 對應 Sulfamonomethoxine 標準液濃度之面積比

溶液號碼	濃度 (µg / ml)	於 397 nm 的吸光度	迴歸值
ST 1	25	0.1730	0.1744
ST 2	37.5	0.2613	0.2584
ST 3	50	0.3410	0.3424
SA 1	38.4	0.2645	
SA 2	42.9	0.2946	

■— Sulfamonomethoxine 之光度分析測定值及曲線■

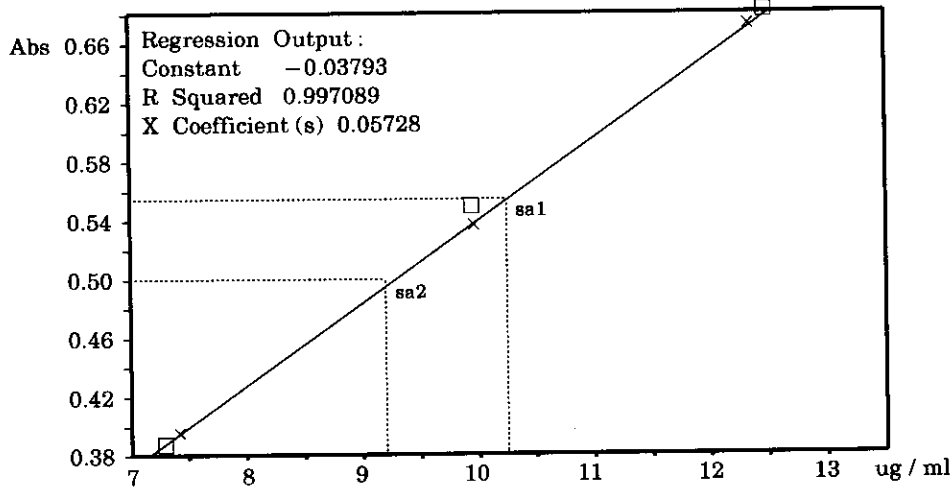


□ 為測定值 -X-X- 迴歸線
 ----- 為檢品 1, 2 對應 Sulfamonomethoxine 標準液濃度之面積比

Area Sulfamonomethoxine	ST 為標準液				Sa 為檢品	
	ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	Sa 1	Sa 2
A 1	135792	277041	395963	538619	240340	104169
Sulfamerazine A 2	246220	242379	246972	242971	239924	242587
Ratio A 1 / A 2	0.552	1.143	1.603	2.271	1.002	0.419
Regression (s)	0.534	1.102	1.651	2.200		
Sulfamonomethoxine Conc. ppm	5.0	10.0	15.0	20.0	<u>9.1</u>	<u>3.8</u>

A1 A2 為四次波峰面積平均值 R 為迴歸值

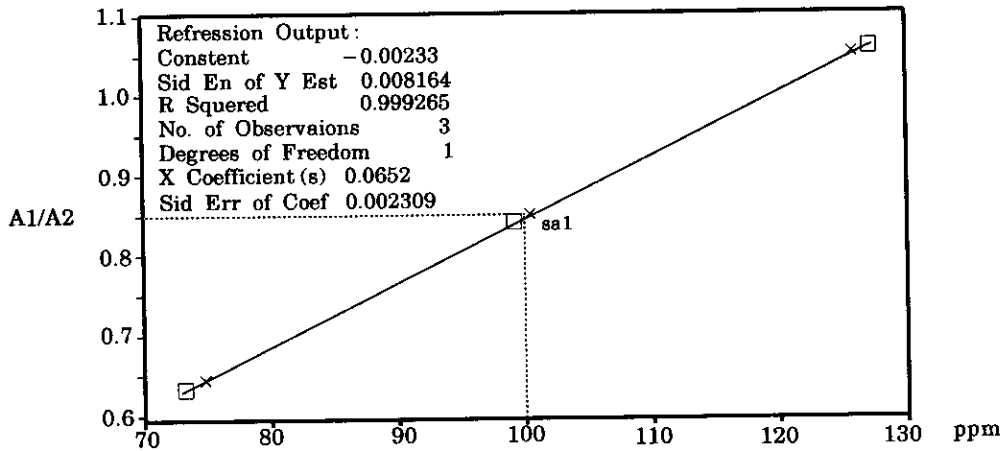
■二 Sulfamonomethoxine 之 HPLC 測定值及曲線■



□ 為測定值 -X-X- 迴歸線
 為檢品 1, 2 對應 Prednisolone 標準液濃度之面積比

溶液號碼	濃度 (µg / ml)	於 525 nm 的吸光度	迴歸值
ST 1	7.5	0.3872	0.3917
ST 2	10	0.5438	0.5349
ST 3	12.5	0.6736	0.6781
Sa 1	10.2	0.5475	
Sa 2	9.3	0.4950	

■三 Prednisolone 之光度分析測定值及曲線■

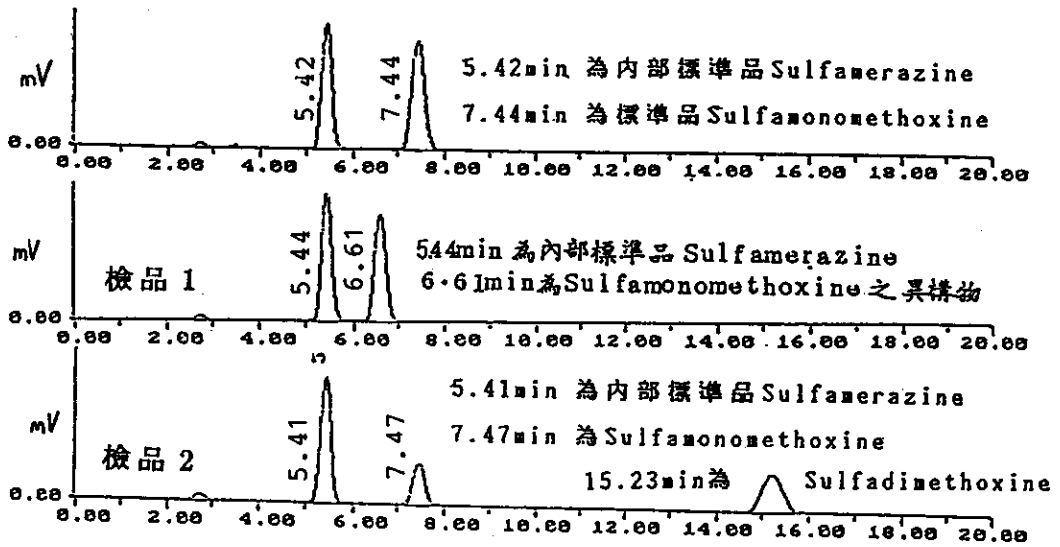


□ 為測定值 -X-X- 迴歸線
 為檢品 1 對應 Prednisolone 標準液濃度之面積比

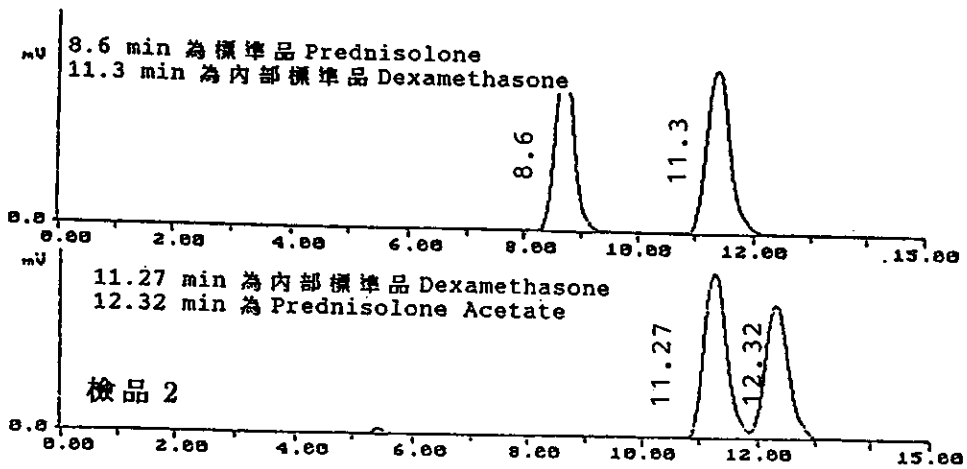
Area Prednisolone	ST 為標準液 Sa 為檢品				
	ST 1	ST 2	ST 3	Sa 1	Sa 2
A 1	1756664	2305512	2927650	2379853	2339652
Dexamethasone A 2	2745771	2736504	2746381	2750116	2722243
Ratio A 1 / A 2	0.640	0.843	1.0650	0.847	X
Regression (s)	0.63667	0.84967	1.06257		
Prednisolone	75	100	125	99.7	X

A1 A2 為四次波峰面積平均值 R 為迴歸值

■四 Prednisolone 之 HPLC 測定值及曲線■



■ 5 Sulfamonomethoxine 及檢品 1、檢品 2 HPLC 檢測下之層析圖



■ 6 Prednisolone 及檢品 2 HPLC 檢測下之層析圖

2. Prednisolone 標準品及檢品 HPLC 檢測所得結果 (圖四), 檢品 1、檢品 2 之 Prednisolone 分別相當於標示含量之 99.7% 及 101.2%, 檢品 2 雖標示其相對應之濃度, 但 HPLC 檢測發現波峰滯留時間與標準品不符 (圖六)。

討論

動物用磺胺劑之製劑檢品 1 依日本藥典之鑑別試驗並無發現有何不符, 惟 HPLC 檢測則發現波峰滯留時間與原專利產品 (第一製藥產品) 不同, 推測應屬不同化合物, 經與 Sulfamonomethoxine 之異構物標準品比對結果屬 Sulfamonomethoxine 之同分異構物。

磺胺劑檢品 2 經檢測結果 Sulfamonomethoxine 濃度不足, 且 15.23 分有一波峰出現, 經與 Sulfadimethoxine 之標準品比對結果屬 Sulfadimethoxine。

類固醇檢品 2 經檢測結果波峰滯留時間與標準品 Prednisolone 不符, 經與 Prednisolone Acetate 之標準品比對結果為 Prednisolone Acetate。

一般 Sulfa Drug 藉分光光度檢測之理由為易顯示比色分析法的基本原則 (香莢蘭醛和芳香族胺間之酸催化平衡反應形成黃色化合物) 在此分析過程中, 無色化合物變為有色的衍生物, 顏色的強度與

分析物的濃度成正比, 而傳統化滴定法亦是一種快速簡便之檢驗法, 惟此二法均為芳香族胺之通性反應不能分辨 Sulfa Drug 之同類間藥物, 而 HPLC 檢驗所須費用雖較高但可同時達成鑑別及成份含量測定, 同樣的在醣質類固醇荷爾蒙製劑, 呈色反應亦為通性反應無法區分鹽類差異, 而 HPLC 剛好克服了此項問題, 達成鑑別及成份含量測定。

目前動物用藥品之檢定藥典之方法以滴定及 UV 法較多, HPLC 法漸有使用, 惟各藥廠基於方便或習慣上採用滴定法及 UV 法者多, 雖皆可得良好結果, 但由本實驗得知 HPLC 法能有更微細之藥品主成份鑑別功能, 故建議藥廠在往後制定藥品檢驗規格時能多採用 HPLC 檢測法以為參考。

參考文獻

1. 中華藥典 III 365-366, 1980。行政院衛生署編印。
2. 郭美月、劉培柏、劉敏主: 應用高效液相層析法對雞飼料中磺胺二甲氧嘧啶及磺胺奎林之同時檢測。省畜衛所研報 27: 45-52, 1994。
3. 郭進安。藥品鑑定學下冊。合記圖書出版社發行。21-29, 112-115。
4. British Pharmacopoeia Veterinary 141, 1985。
5. The Pharmacopoeia of Japan Twelfth Edition 520-521, 1991。

Comparative Studies on Sulfadrug and steroid hormone preparations by High performance Liquid Chromatography Chemical titration and Spectrophotometry.

* P. S. Gong, M. C. Liu, K. M. Lin, Y. F. Sheu and S. Y. Lin

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health. Taiwan, R.O.C.

SUMMARY Sulfamonomethoxine preparations assayed by chemical titration (sodium nitrates titration with aromatic 1 °C amine diazotization) · UV spectrophotometry (UV method) (reacted with 3 % Vanillin and detected with UV 397 nm) and high performance liquid chromatography (HPLC) (column Lichrosorb RP-18, mobile phase acetonitrile : 1 % acetic acid = 25 : 75, wavelength 280 nm). Prednisolone preparations assayed by UV method (reacted with tetrazolium blue and tetramethylammonium hydroxide, detected with 525 nm) and HPLC (column Lichrosorb RP-18, mobile phase methanol : H₂O = 58 : 42, wavelength 254 nm) These methods obtained the good results, but chemical titration and UV method couldn't differentiate different sulfadruugs or prednisolone base with its salts. However HPLC could solve these problem.

Key words: *High Performance Liquid Chromatography, Spectrophotometry Ultraviolet Chemical titration, Glucocorticoid steroid hormone.*

*Corresponding author

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health. Taiwan, R.O.C.